

10/502539
PCT/KR 02/01268

RO/KR 04.07.2002

REC'D 05 AUG 2002

WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 :
Application Number

특허출원 2002년 제 7495 호
PATENT-2002-0007495

출원 년 월 일 :
Date of Application

2002년 02월 08일
FEB 08, 2002

출원 인 :
Applicant(s)

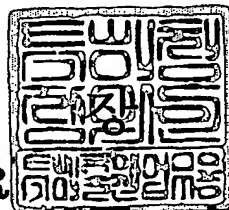
한국과학기술연구원
KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY



2002 년 07 월 04 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.02.08
【발명의 명칭】	네오마이신 -옥사졸리디논 헤테로 이합체, 그의 제조방법 및 그의 용도
【발명의 영문명칭】	HETERODIMERIC CONJUGATES OF NEOMYCIN-OXAZOLIDINONE, THEIR PREPARATION AND THEIR USE
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술연구원
【출원인코드】	3-1998-007751-8
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	1999-041511-2
【대리인】	
【성명】	한인열
【대리인코드】	9-1998-000618-1
【포괄위임등록번호】	2001-012570-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유재훈
【성명의 영문표기】	YU, Jaehoon
【주민등록번호】	590508-1068019
【우편번호】	133-759
【주소】	서울특별시 성동구 옥수동 436 극동그린아파트 102-1403
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이종국
【성명의 영문표기】	LEE, Jongkook
【주민등록번호】	720210-1457431
【우편번호】	157-882

【주소】 서울특별시 강서구 화곡7동 351-89 중앙화곡하이츠아파트 4-806
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 권미윤
【성명의 영문표기】 KWON,Miyun
【주민등록번호】 711230-2123225
【우편번호】 137-030
【주소】 서울특별시 서초구 잠원동 현대아파트 102-105
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 배애님
【성명의 영문표기】 PAE,Ae Nim
【주민등록번호】 620520-2402931
【우편번호】 138-240
【주소】 서울특별시 송파구 신천동 7, 장미아파트 2-405
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 고훈영
【성명의 영문표기】 KOH,Hun Yeong
【주민등록번호】 560919-1000116
【우편번호】 142-107
【주소】 서울특별시 강북구 미아7동 1353 SK북한산시티아파트 110-701
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 6
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대
리인
희 (인) 대리인
한인열 (인) 이원

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
---------	----	---	--------	---

【가산출원료】	10	면	10,000	원
---------	----	---	--------	---

【우선권주장료】	0	건	0	원
----------	---	---	---	---

【심사청구료】	9	항	397,000	원
---------	---	---	---------	---

【합계】	436,000	원		
------	---------	---	--	--

【감면사유】	정부출연연구기관			
--------	----------	--	--	--

【감면후 수수료】	218,000	원		
-----------	---------	---	--	--

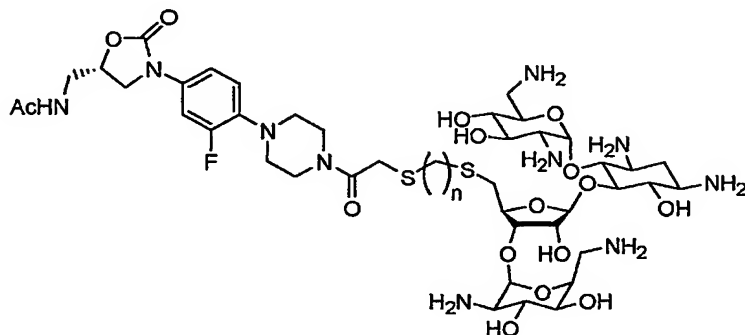
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통			
--------	-------------------	--	--	--

【요약서】

【요약】

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체, 그의 제조방법 및 그의 용도에 관한 것이다. 상기 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 옥사졸리디논과 네오마이신을 스페이서로 연결된 헤테로 이합체 구조를 가짐으로 RNA 모티프(motif)인 스템(stem)과 룹(loop)을 동시에 인식할 수 있으며, 특정의 RNA에 대해 우수한 결합력을 나타내어 이를 이용하여 항바이러스 치료제 및 항박테리아 치료제로 유용하게 사용할 수 있다.

화학식 1



(상기식에서, Ac 및 n은 명세서 내에서 정의한 바와 같다.)

【색인어】

네오마이신-옥사졸리디논 이합체, 항바이러스제, 항박테리아제

【명세서】

【발명의 명칭】

네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체, 그의 제조방법 및 그의 용도{HETERODIMERIC CONJUGATES OF NEOMYCIN-OXAZOLIDINONE, THEIR PREPARATION AND THEIR USE}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <1> 본 발명은 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체, 그의 제조방법 및 그의 용도에 관한 것이다.
- <2> 지금까지의 대부분의 약은 유전자의 마지막 산물인 단백질을 표적 분자로 사용하는 것으로, 전체 약물의 70~80%를 점유하고 있다. 그러나, 단백질을 인코딩(encoding)하는 RNA에 분자가 약의 표적 분자가 될 수 있다는 것이 잘 알려지면서, RNA에 작용할 수 있는 약물에 대한 관심이 높아지고 있다.
- <3> RNA 분자에 대한 구조학적인 연구가 진행되면서, RNA 분자가 가장 안정한 형태가 되기 위해서는 스스로가 폴딩되어 염기쌍(base-pairings)을 이루고 있어야 한다. 특히, RNA는 DNA와는 다르게 염기쌍을 이루지 못하는 부분(loop)을 가지고 있으며, 이들 루프와 함께 독특한 2차 구조 또는 3차 구조를 이루고 있다는 것이 발견되었다. 이들 3차 구조는 결국 염기서열 특이적인 3 차원적인 구조를 형성하고, 작은 화합물들이 잘 결합할 수 있는 안정된 주머니(pocket) 모양을 이루고 있다.

<4> 포켓 모양의 RNA 구조는 세포 내에서 단백질을 생산하는 리보솜(ribosome)을 이루고 있는 리보솜 RNA(ribosomal RNA, rRNA)에서 발견된다. 대장균 등의 병원체에서 단백질을 생산하는 리보솜에서는 16S RNA의 A 사이트(site) 등 RNA 염기 서열이 매우 잘 보존되어 있는 부분이 있으며, 이런 부분은 병원체의 단백질 합성을 억제할 수 있는 목표 작용점이 될 수 있다. 일례로, 아미노글라이코사이드(aminoglycoside)는 아미노기(amino group)를 가지고 있으며, 생리적 pH에서 양전하를 띠는 일반적인 약으로서 음전하된 특정한 부위의 rRNA인 16S rRNA A 사이트에 결합 작용점이 된다는 것이 이미 알려져 있다. NMR 구조연구에 의하면, RNA의 스템(stem)부분에 아미노글리코사이드가 결합함으로써 스템의 구조가 약간 벌어진 형태의 확장된 루프(extended loop)를 이루는 것이 밝혀졌다. 그러나 이처럼 RNA에 결합하는 아미노글리코사이드는 그 특이성에서 약간의 문제점을 가지고 있다. 즉, 양전하된 아미노글리코사이드는 음전하된 RNA의 결합 부위에 잘 결합하지만, 이와 같은 결합은 비교적 특이적이지 못하며, 실제로 아미노글리코사이드는 2 차원적 또는 3 차원적 구조를 가진 어떤 RNA 에도 마이크로몰(microm) 정도의 결합력을 가지고 있으며, 이런 특이적이지 못한 결합력으로 인하여, 아미노글리코사이드의 약으로서의 효용성이 떨어지고 있다.

<5> 또한, 특이적인 결합을 보이지 않는 아미노글리코사이드를 특이적 화합물로 만들려는 시도가 진행되고 있다. 첫 번째로 기존의 아미노글리코사이드를 이합체(dimer)로 제조하는 것으로, 몇 개의 연구진들이 이와 같은 호모이합체(homodimer)를 만들어 특정 RNA에 특이적인 결합성을 높이는 연구를 진

행하였다. 결합력을 가진 두 개의 같은 부위는 일반적으로 강한 결합력을 나타내는 것으로 알려져 있으므로, 아미노글리코사이드의 호모이합체는 특정 RNA에 특이성이 증진된 형태를 나타낼 수 있으리라 기대했다. 그러나, 아미노글리코사이드 호모이합체는 그 결합 부위가 RNA에 2 개 존재할 때만이 큰 결합력 변화가 관측되었을 뿐, 화합물이 가지는 특이성에는 큰 변화가 없었다. 두번째로, 헤테로 이합체 (hetero-dimer) 아미노글리코사이드를 제조하는 것으로, 아미노글라이코사이드와 새로운 작용기를 가진 화합물을 결합하는 것이다. Tor 연구팀이 최근 진행한 연구에 의하면, 아크리딘(acridine)이라는 조그마한 화합물과 아미노글리코사이드의 결합에 의한 헤테로 이합체는 특정한 RNA(RRE motif)에 각각의 단일체에 비해 약 100배 정도의 특이성의 증진을 나타내었다. 아크리딘의 역할은 염기쌍을 이루고 있는 스템 부분에 돌출된 벌지(bulge)의 염기와 아크리딘 사이의 인식에 의하여 전체적인 결합력이 증진시킨다. 이와 같이, 헤테로 이합체는 두 개의 다른 부분을 인식할 수 있는 두 개의 분자를 연결하는 것이다.

<6> 지금까지 알려진 바로는 아미노글리코사이드의 RNA 결합부위가 RNA의 스템 부분으로, 스템이라는 모양 특이적인 결합력을 가지고 있지만, 염기서열 특이적이지는 못하다는 것이다. 따라서, 특정한 서열을 가진 RNA 모티프에 결합하는 화합물은 룽(loop) 특이적인 구조를 인식할 수 있는 화합물과 스템 특이적 결합을 하는 아미노글리코사이드이 연결된 헤테로 이합체 형태를 가지며, 이를 제조하기 위한 두 화합물의 연결은 특이성 증진을 위하여 매우 중요하다. 본 발명자들은 이미 RNA의 룽에 잘 결합하는 화합물로 알려진 화합물 중에 클로람페니콜을 택하여 아미

노글리코사이드 중에 가장 결합력이 뛰어난 네오마이신과 결합을 시도하였다. 두 화합물의 연결은 네오마이신과 클로람페니콜의 약효 중 가장 덜 영향을 주는 두 부위를 선택하여 합성하였으며, 합성된 헤테로 이합체는 몇가지 RNA 모티프에서 매우 증진된 특이성을 보여주었다.

<7> 한편, 최근에 개발된 항생제 중 하나인 옥사졸리디논(oxazolidinone) 계열의 화합물은 정확한 부위는 아직 밝혀지지 않았으나, 23S rRNA의 일부에 결합하여 약효를 나타내는 RNA 결합 물질로서, 기존에 23S rRNA 에 결합하는 크로람페니콜 또는 마크로라이드 등의 결합 부위와는 다른 부위에 결합할 가능성을 제시하고 있다.

<8> 이에, 본 발명자들은 옥사졸리디논과 네오마이신을 스페이서로 결합시킨 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 합성하였으며, 본 발명의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체가 RNA의 모티프인 스템과 룩을 동시에 인식하며, 특정의 RNA에 대한 결합력이 우수하였으며 또한 염기서열 특이적 특성을 가지고 있음을 알아내어 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<9> 본 발명의 목적은 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체, 그의 제조방법 및 그의 용도를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<10> 상기 목적을 달성하기 위해서,

<11> 본 발명은 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 제공한다.

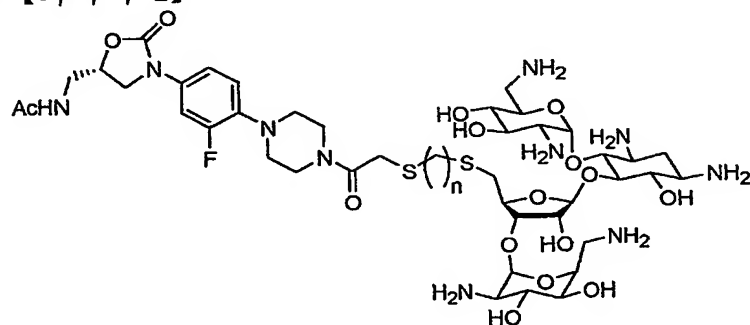
<12> 또한, 본 발명은 상기 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 제조방법을 제공한다.

<13> 또한, 본 발명은 상기 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 유효성분으로 하는 항바이러스 치료제 또는 항박테리아 치료제를 제공한다.

<14> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<15> 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 포함한다.

<16> 【화학식 1】



<17> (상기식에서, n은 2~10의 정수이며, 바람직하게는 6이며,

<18> Ac는 아세틸기를 나타낸 것이다.)

<19> 상기 화학식 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 네오마이신과 옥사졸리디논의 중심 골격을 적당한 길이의 탄소 사슬을 가진 스페이서로 연결되어 헤테로 이합체의 구조를 형성한다.

<20> 구체적으로, RNA의 립에 잘 결합하는 화합물로 알려진 옥사졸리디논 화합물과 아미노글리코사이드 중에서 RNA에 대한 결합력이 우수한 네오마이신을 상기 두 화합물의 약효 중 가장 덜 영향을 미치는 부위를 선택하여 스페이서를 이용하여 결합하였다. 상기

스페이서는 디메르카토 화합물을 이용하였으며, 바람직하게는 스페이서의 탄소수가 6이다.

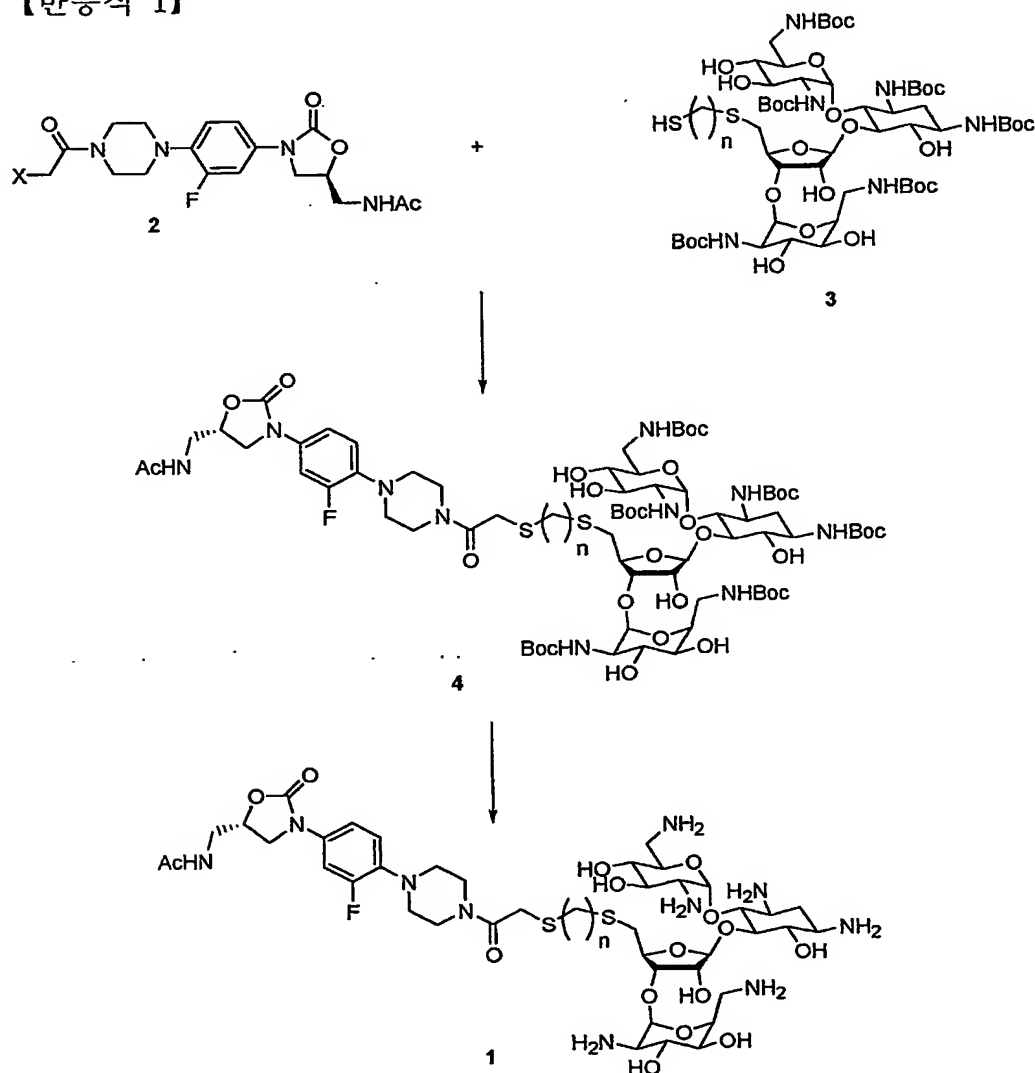
<21> 본 발명의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 특정 RNA의 모티프인 스템과 룬을 동시에 인식할 수 있으며, 이로 인해 특정 RNA(16S rRNA, 23S rRNA)에 대해 결합력이 더욱 향상된다. 하기 실시예에 의하면 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 16S rRNA 또는 23S rRNA에 특이적이며, 강력학 결합력을 나타내고 있다. 구체적으로, 16S rRNA와 23S rRNA에 대해서 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체가 네오마이신에 비해 각각 60 배 및 30 배 이상의 결합력의 향상을 나타내었으며, 옥사졸리디논에 대해 각각 300 배 및 4,000 배의 결합력 증가를 나타내었다. 또한, RRE RNA의 경우에는 결합력의 변화가 오히려 네오마이신 단일체에 비해 떨어지는 결과를 나타내는데, 이는 헤테로 이합체에 의한 결합력의 변화가 관찰되는 RNA도 그 종류에 따라 결합력 향상의 크기가 매우 다르며, RNA 모티프가 모두 스템과 룬을 가지고 있다 하더라도 그 중에서도 특이적인 염기서열을 가진 rRNA만에 대한 특이적인 결합을 나타냄을 알 수 있다. 23S rRNA의 경우 매우 짧은 RNA 서열임에도 불구하고 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체가 가지는 결합력은 향상되었는데, 이는 길이가 비교적 긴 RRE RNA의 경우 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 결합력이 네오마이신 단일체의 결합력에 비해 감소하는 것과 비교할 때 본 발명의 헤테로 이합체는 RNA에 대해 특이적으로 결합함을 알 수 있다.

<22> 본 발명은 하기 반응식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 제조방법을 포함한다.

<23> 구체적으로, 하기 반응식 1에서 보는 바와 같이,

- <24> 화학식 2의 화합물을 염기 존재하에 화학식 3의 화합물과 반응시켜 화학식 4의 화합물을 얻는 단계(단계 1); 및
- <25> 얻어진 화학식 4의 화합물과 탈보호제를 반응시켜 화학식 1의 화합물을 얻는 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 제조방법을 포함한다.

<26> 【반응식 1】

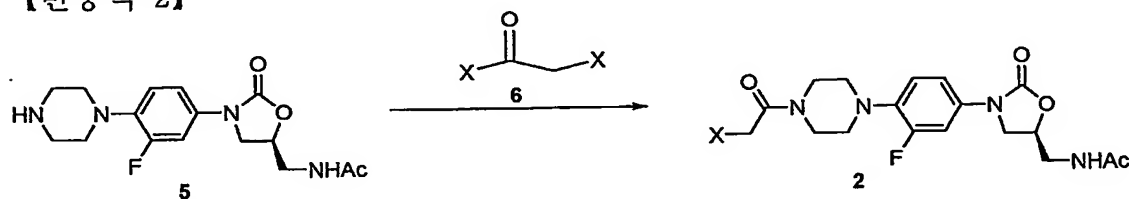


<27> (상기식에서, n 이 2~10의 정수이며, 바람직하게는 6이며,

<28> X 는 플루오로, 클로로 또는 브롬이며,

- <29> Ac는 아세틸기이며,
- <30> Boc는 *t*-부틸옥시카르보닐기를 나타낸 것이다.)
- <31> 단계 1은 염기존재하에 화학식 2의 화합물과 화학식 3의 화합물을 상온에서 5~10 시간동안 반응시켜 화학식 4의 화합물을 얻는 것으로, 상기 염기는 K_2CO_3 , Na_2CO_3 또는 Cs_2CO_3 를 사용하며, 바람직하게는 Cs_2CO_3 를 사용한다. 이때 용매는 DMF(dimethylformamide), DMSO(dimethyl sulfoxide) 또는 아세토나트릴(acetonitrile)을 사용하며, 바람직하게는 DMF를 사용한다.
- <32> 단계 2는 얻어진 화학식 4의 화합물의 *t*-부틸옥시카르보닐기(*t*-butyloxycarbonyl, Boc)을 탈보호하기 위해 염산, 황산, 질산, 초산 또는 삼불화초산을 사용하며, 바람직하게는 삼불화초산을 사용한다.
- <33> 또한, 상기 화학식 2의 화합물은 하기 반응식 2와 같이, 하기 화학식 5의 화합물을 염기 존재하에 화학식 6의 화합물과 반응시켜 얻어진다. 바람직하게 상기 반응시 염기는 피리딘을 사용하며, 용매는 CH_2Cl_2 를 사용한다. 또한, 반응온도는 $0^\circ C$ 이며, 반응시간은 2 시간이 바람직하다.

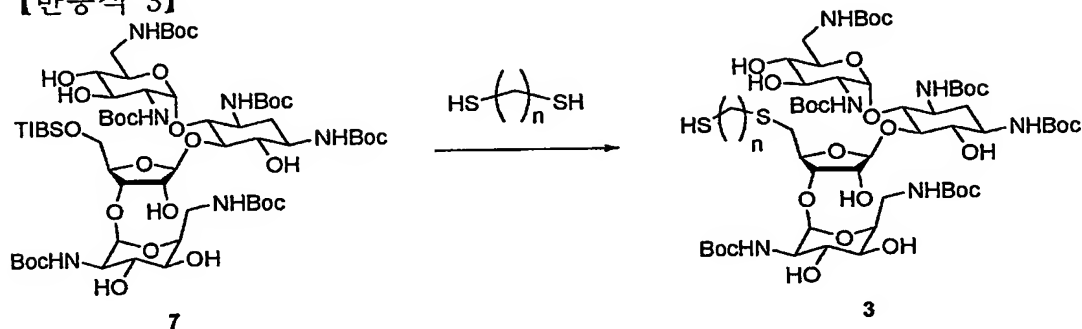
<34> 【반응식 2】



- <35> (상기식에서, Ac는 아세틸기를 나타낸 것이며,
- <36> X는 각각 독립적으로, Cl, Br 또는 F이다.)

<37> 상기 화학식 3의 화합물은 하기 반응식 3과 같이, 화학식 7의 화합물을 염기 존재 하에 디메르캅토 화합물과 반응시켜 얻어진다.

<38> 【반응식 3】



<39> (상기식에서, n 은 2~10의 정수이며, 바람직하게는 6이며,

<40> Boc는 t-부틸옥시카르보닐기를 나타낸 것이며,

<41> TIBSO는 트리이소프로필술포닐기를 나타낸 것이며,

<42> n 은 2~10의 정수이며, 바람직하게는 6이다.)

<43> 화학식 7로 표시되는 화합물은 네오마이신으로부터 종래 공지된 방법으로 제조하였다.

<44> 화학식 3의 화합물은 구체적으로, 디메르캅토 화합물과 화학식 7의 화합물을 염기 존재하에 치환반응시켜 제조한다. 상기 디메르캅토 화합물은 1,6-헥산디티올이 바람직하며, 염기는 K_2CO_3 , Na_2CO_3 또는 Cs_2CO_3 를 사용하며, 또한 용매는 DMF, DMSO 또는 아세토니트릴을 사용한다.

<45> 또한, 본 발명은 상기 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 유효성분으로 하는 항바이러스 치료제 또는 항박테리아 치료제를 포함한다.

<46> 본 발명의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 RNA 모티프인 스템과 립을 동시에 인식할 수 있어 대장균 등의 병원체에서 리보솜에 존재하는 특정의 RNA(16S rRNA, RRE RNA, 23S rRNA)에 대해 우수한 결합력을 나타내며, 이로 인해 병원체의 단백질의 합성을 억제할 수 있는 항바이러스 치료제 또는 항박테리아 치료제로 사용할 수 있다.

<47> 화학식 1의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 임상투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 화학식 1의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

<48> 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 물활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 증증 정도에 따라 적절히 선택되

나, 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 화학식 1의 화합물을 0.1~50 mg의 양으로 1회 내지 수회 나누어 투여할 수 있으며, 바람직하기로는 0.1~10 mg이다.

<49> 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다.

<50> 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<51> <제조예 1> 화학식 2의 화합물 제조

<52> 34 mg(0.10 mmol)의 화학식 5의 옥사졸리디논 유도체(Oxazolidinone derivative, Brickner et al., *J. Med. Chem.* 1996, 39, 673~679)에 이염화탄소 (2.0 ml)를 첨가한 현탁액에 피리딘(0.025 ml, 0.31 mmol)과 브로모아세틸 브로마이드(bromoacetyl bromide; 0.013 ml, 0.15 mmol)를 0 °C에서 첨가하였다. 얻어진 반응혼합물을 같은 온도에서 1시간 동안 교반한 후 에틸 아세테이트로 희석시켰다. 얻어진 혼합물을 소금물로 세척한 후 유층을 무수 Na₂SO₄로 건조시키고 감압농축하였다. 얻어진 농축물을 실리카겔 크로마토그래피(CH₂Cl₂:MeOH=10:1)로 정제하여 흰색의 고체인 화학식 2의 화합물(33 mg, 72%)를 얻었다.

<53> ¹H NMR(CDCl₃, 300 MHz) δ 7.50 (dd, J=14.2, 2.5 Hz, 1H), 7.10 (dd, J=8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.99 (t, J=9.0 Hz, 1H), 6.13 (t, J=6.1 Hz, 1H), 4.82~4.76 (m, 1H), 4.13~3.51 (m, 10H), 3.16 (t, J=4.9 Hz, 2H), 3.08 (t, J=5.0 Hz, 2H), 2.04 (s, 3H).

<54> <실시예 1> 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 제조

<55> (단계 1) 화학식 4의 화합물의 제조

<56> DMF(1.5 ml)에 화학식 3의 화합물(97 mg, 0.072 mmol)과 화학식 2의 화합물(33 mg, 0.072 mmol)를 용해한 후 Cs_2CO_3 (24 mg, 0.074 mmol)를 첨가하였다. 얻어진 반응혼합물을 15시간 동안 교반한 후 반응혼합물을 물에 부었다. 에틸 아세테이트(100 ml)로 추출한 후 유층을 소금물로 세척하였다. 상기 유층을 무수 Na_2SO_4 로 건조시킨 후 감압농축하였다. 얻어진 농축물을 실리카겔 크로마토그래피($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=10:1$)로 정제하여 흰색의 고체인 화학식 4의 화합물(101 mg, 81%)을 얻었다.

<57> ^1H NMR(CD_3OD , 300 MHz) δ 7.53 (dd, $J=14.5, 2.4$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J=8.8$ Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.07 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 6.68 (br d, $J=6.68$ Hz, 1H), 6.49 (br d, $J=6.3$ Hz, 1H), 5.32 (br s, 1H), 5.19 (br s, 1H), 4.94 (br s, 1H), 4.83~4.75 (m, 1H), 4.23~2.60 (m, 39 H), 1.97 (s, 3H), 1.65~1.24 (m, 64H).

<58> (단계 2) 화학식 1의 네오마이신-옥사졸리디논 헥테로 이합체의 제조

<59> 상기 화학식 4의 화합물(101 mg, 0.059 mmol)과 삼불화초산(Trifluoroacetic acid, TFA; 1.5 ml)을 혼합하고 30분간 상온에서 교반하였다. 얻어진 반응혼합물을 감압농축한 후 얻어진 농축물을 prep-HPLC (RP-C18 column, 0.1 % TFA를 함유한 $\text{H}_2\text{O}:\text{0.1 \% TFA}$ 를 함유한 $\text{MeCN}=70:30$)로 정제하고 동결건조하여 흰색의 고체인 화학식 1의 네오마이신-옥사졸리디논 헥테로 이합체(78 mg, 69 %)를 얻었다.

<60> ^1H NMR(D_2O , 300 MHz) δ 7.09 (dd, $J=14.0, 1.9$ Hz, 1H), 6.91~6.87 (m, 2H), 5.70 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 4.94 (d, $J=1.4$ Hz, 1H), 4.04~2.69 (m, 38H), 2.45 (dd, $J=13.4, 7.6$ Hz, 1H), 2.27 (q, $J=7.3$ Hz, 4H), 2.17~2.11 (m, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.54 (q, $J=12.6$ Hz, 1H), 1.29~1.18 (m, 4H), 1.05~1.01 (m, 4H).

<61> ^{13}C NMR(D_2O , 75 MHz) δ 175.2, 171.2, 163.9 (q, $J=35.2$ Hz), 157.0, 134.7, 120.9, 116.7 (q, $J=290.1$ Hz), 116.2, 110.8, 109.0, 108.7, 96.0, 95.5, 85.8, 80.5, 78.9, 75.4, 74.1, 73.2, 72.8, 71.3, 70.4, 69.8, 68.3, 68.0, 67.7, 54.0, 51.4, 51.2, 51.0, 50.0, 48.7, 48.6, 46.2, 42.1, 40.8, 40.7, 34.6, 33.0, 32.1, 31.9, 29.1, 28.7, 28.3, 27.9, 27.7, 22.1.

<62> <제조예 2> 특이적 RNA의 실험관적 제법

<63> 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 16S rRNA의 센스 RNA와 서열번호 2로 기재되는 16S rRNA의 안티센스 RNA,

<64> 서열번호 3으로 기재되는 RRE RNA의 센스 RNA와 서열번호 4로 기재되는 RRE RNA의 안티센스 RNA, 및

<65> 서열번호 5로 기재되는 23S rRNA의 센스 RNA와 서열번호 6으로 기재되는 23S rRNA의 안티센스 RNA를 제조하였다.

<66> 구체적으로, 두 가닥의 DNA(센스 (sense)와 안티센스(anti-sense), 각각 2.5 nanomole), 5 \times 완충용액(200 mM Tris-HCl, 30 mM MgCl_2 , 10 mM 스퍼미딘(spermidine), 50 mM NaCl, pH 7.9; 20 μl), 100 mM DL-다이타이오테이트(dithiotheitol, DTT; 20 μl), 네 개의 2.5 mM 뉴클레오타이드 트라이 포스페이트 혼합물(NTP 혼합물, 20 μl), T7 RNA 폴리머라제(polymerase, 50 units/ml; 1 μl) 및 증류된 물(34 μl)을 37°C에서 2 시간동안 배양하였다. 이후, 1 μl 의 RNA 분해효소가 들어있지 않은(RNase-free) RQ1 DNA 분해효소(DNase, 1 unit/ml)를 첨가하고 10 분간 37°C에서 배양하였다. 얻어진 용액에 100 μl 의 PCI 혼합액 (페놀:클로로포름:이소프로판올=25:24:1)을 첨가하고 5 분간 상온

에서 흔들었다. 얻어진 용액을 14000 rpm에서 10 분간 원심 분리하였다. 상등액을 새로운 튜브에 넣고 에탄올 침전에 의하여 RNA를 농축시켰다. 얻어진 RNA는 20 mA의 전기를 걸어 30 분간 전기영동하여 7.0 M 우레아(urea)가 함유된 6 %의 폴리아크릴아미드(polyacrylamide)에서 정제하였다. UV 손전등에 의하여 밝혀진 RNA 밴드(band)를 자르고 새로운 튜브에 옮겨 500 μ l의 용출 완충용액(elution buffer, 0.5 M 암모늄 아세테이트(ammonium acetate), 1 mM EDTA, 0.2 % SDS, pH 8.0)을 첨가하고 37℃에서 4 시간동안 방치하였다. 용출된 RNA를 새튜브로 옮기고 페놀추출법 및 에탄올 침전법에 의하여 정제하였다. 정제 된 RNA의 양은 260 nm UV 스펙트럼으로 확인하였다.

<67> <실험예 1> 특이적 RNA에 결합하는 상수의 결정

<68> 테트라메틸로다민(Tetramethylrhodamine)이 결합된 파로모마이신(paromomycin, 하기 "CRP"라 칭한다.)은 하바드 의과대학의 란도(Rando) 교수팀에서 얻어서 사용하였으며, 이것을 형광 발광화합물(fluorescent probe)로 사용하였다. 형광 비등방성(anisotropy) 측정은 Perkin-Elmer LS-50B 형광 분광측정기에 20℃의 항온조를 설치하여 수행하였다. CRP의 형광흡수는 510 nm 또한 그 형광발광은 550 nm에서 관찰하였다. 데이터 한점을 얻는데 적어도 7 번의 측정을 수행하였으며 그 중 가장 큰 값과 가장 작은 값을 제거하고 다섯 개의 평균값을 데이터로 이용하였다. 형광의 측정은 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl₂, 및 20 mM HEPES pH 7.5를 이용한 완충용액에서 수행하였다. CRP와 제조된 RNA간의 결합상수(Kd)를 측정하는 식은 하기 수학식 1과 같다.

<69>
$$A=A_0+DA\{([RNA]_0+[CRP]_0+K_d)-([RNA]_0[CRP]_0+K_d)^{1/2}-4[RNA]_0[CRP]_0^{1/2}\} \div 2$$

【수학식 1】

<70> (상기식에서,

- <71> A는 RNA가 있을 때의 CRP의 형광 이동방성 값이며,
 <72> A₀는 RNA가 없을 때의 CRP의 형광 이동방성 값이며,
 <73> DA는 여러 RNA 농도에서 RNA가 없을 때의 형광 이동방성의 값을 뺀 숫자이며,
 <74> [RNA]₀는 RNA의 초기 농도이며,
 <75> [CRP]₀는 CRP의 초기 농도이며,
 <76> K_d는 결합상수이다.)
 <77> 상기 RNA와 CRP의 결합을 유도한 후에 새롭게 제조된 화합물을 용액에 넣으면, 경쟁적인 결합 반응에 의하여 CRP는 RNA로부터 분리되고 측정하고자 하는 화합물은 RNA에 결합하여 KD값을 가지게 된다. 이 KD 값을 산출하는 식은 하기 수학식 2와 같으며, K_d와 KD는 일직선이 아닌 커브 맞춤(non-linear curve fitting) 방법에 의하여 산출하였다. 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

$$\text{<78> } [\text{Aminoglycoside}]_0 = \{KD(A_\infty - A) / [K_d(A - A_0) + 1]\} \times \{[\text{RNA}]_0 - K_d(A - A_0) / (A_\infty - A_0) -$$

$$[\text{CRP}]_0(A - A_0) / (A_\infty - A_0)\}$$

【수학식 2】

- <79> (상기 식에서,
 <80> KD는 RNA와 새로운 아미노글리코사이드와의 결합상수이며,
 <81> [Aminoglycoside]₀는 측정하고자 하는 아미노글리코사이드의 초기농도이며,
 <82> A는 측정도중 형광 이동방성 값이며,
 <83> A_∞는 모두 결합되어 있을 때 형광 이동방성 값이며,
 <84> A₀는 모두 자유로울때의 형광 이동방성 값이다.)

<85> 【표 1】

각 RNA에 대한 헤테로 이합체의 결합력 비교(KD) (단위 microM)

	네오마이신	옥사졸리디논	네오마이신-옥사졸리디논
16S rRNA	> 2	10.3	0.034
RRE RNA	0.18	결합하지 않음	0.54
23S rRNA	> 2	260	0.063

<86> 상기 표 1에서 나타낸 바와 같이, 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로-이합체 화합물은 16S rRNA 또는 23S rRNA에 네오마이신에 비하여 증진된 결합력을 나타내었으므로, 일반적인 이합체 결합력의 증진이 본 발명에서도 관찰되어진다. 하지만 RRE RNA의 경우에는 결합력의 변화가 오히려 네오마이신 자체에 비하여 떨어지는 결과를 나타내어 헤테로-이합체에 의한 결합력의 변화가 관찰되는 RNA와 그 종류에 따라 결합력 향상의 크기가 매우 다르게 나타남을 알 수 있다. 구체적으로, 16S rRNA와 23s rRNA 의 경우에는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체가 네오마이신 단일체에 비하여 각각 60 배 및 30 배 이상의 결합력의 증진을 나타내었으며, 옥사졸리디논 단일체에 비해 각각 300 배 및 4,000 배의 결합력 증가를 관찰할 수 있었다. 상기와 같은 결과는 본 발명에서 제조된 3 개의 RNA 모티프가 모두 스템과 룬을 가지고 있다 하더라도, 그 중에서도 특이적인 염기서열을 가진 rRNA 만이 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로-이합체에 의한 결합력 증가를 나타내고 있으며, 그 결합력의 증가는 23S rRNA의 경우에 가장 크게 관찰되었다. 23S rRNA의 경우, 매우 짧은 RNA 서열임에도 불구하고 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로-이합체가 가지는 결합력은 향상함을 관찰할 수 있는데, 이는 길이가 비교적 긴 RRE RNA의 경우 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로-이합체의 결합력이 네오마이신 자체에 비하여 감소하는 것과 비교되며, 이로 인해 헤테로-이합체의 특이성을 나타내음을 알 수 있다.

<87> <실험예 2> 랫트에 대한 비경구투여 급성 독성 실험

<88> 화학식 1의 화합물의 급성 독성을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다

<89> 6주령의 특정병원부재(SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성 실험을 실시하였다.

본 발명의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 1 ml의 생리식염수에 현탁하여 1 mg/kg의 용량으로 상기 랫트 2 마리의 근육내 주사 투여하였다. 시험물질 투여후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다.

<90> 실험결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상 증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 실험된 화합물은 랫트에서 10 mg/kg 까지 독성변화를 나타내지 않았으며, 비경구 투여 최소치사량(LD₅₀)은 10 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

【발명의 효과】

<91> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로-이합체는 단위체인 네오마이신 및 옥사졸리디논에 비하여 특정한 RNA(16S rRNA, 23S RNA)에 대해 결합력이 우수하며, RNA 모티프인 스템과 룬을 동시에 인식할 수 있으며, 또한 RNA를 이루는 염기서열에 특이적인 특성을 가지고 있다. 이와 같이, 특이적 RNA를 부분을 인식할 수 있는 특이성의 증가는 약의 효능을 증진시킬 수 있을 뿐만

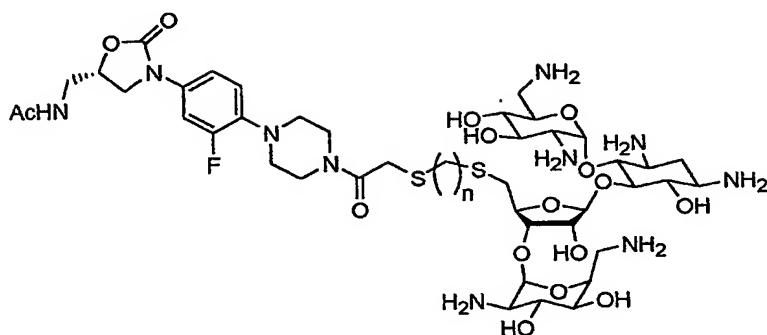
아니라 비특이적 약물에 의한 부작용을 대폭적으로 감소시켜 기존의 약에 비하여 더욱
효능이 우수한 약으로 유용하게 사용할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체.

화학식 1



(상기식에서, n 은 2~10인 정수이며,

Ac는 아세틸기를 나타낸 것이다.)

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 n 이 6인 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체가 16S rRNA, RRE RNA 또는 23S rRNA와 특이적인 결합을 형성하는 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 특이적인 결합이 RNA의 스템과 립을 동시에 인식하는 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체.

【청구항 5】

제 3항에 있어서, 상기 특이적인 결합이 RNA를 이루는 염기서열 특이적인 결합인 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체.

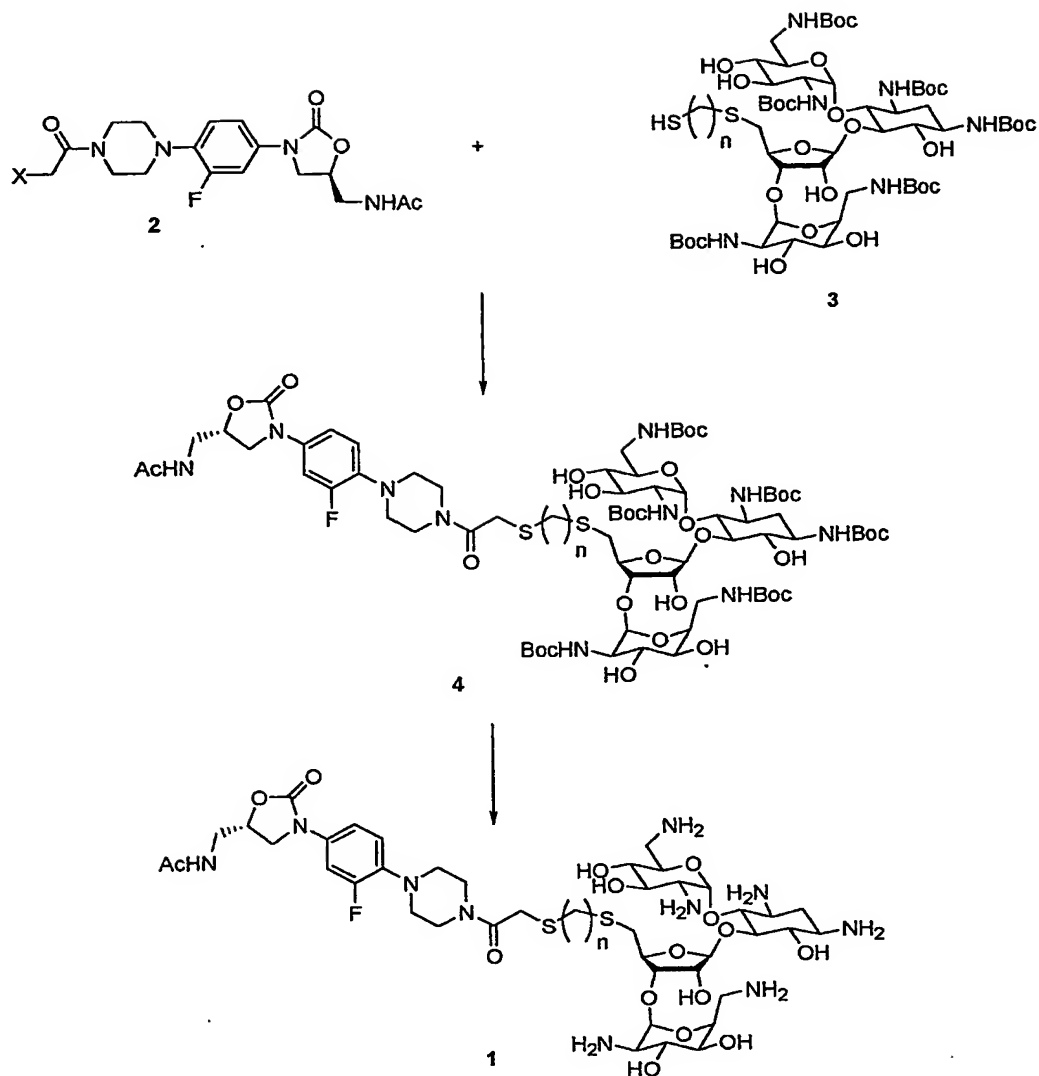
【청구항 6】

하기 반응식 1에서 보는 바와 같이,

화학식 2의 화합물을 염기 존재하에 화학식 3의 화합물과 반응시켜 화학식 4의 화합물을 얻는 단계(단계 1); 및

얻어진 화학식 4의 화합물과 탈보호제를 반응시켜 화학식 1의 화합물을 얻는 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 제조방법.

반응식 1



(상기식에서, n 이 2~10의 정수이며,

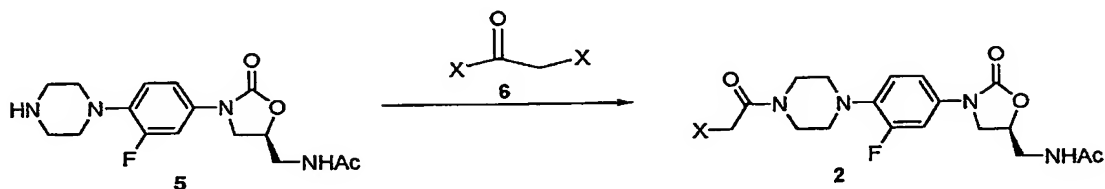
X 는 플루오로, 클로로 또는 브롬이며,

Boc는 *t*-부틸옥시카르보닐기를 나타낸 것이다.)

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 상기 화학식 2의 화합물이 하기 반응식 2와 같이, 하기 화학식 5의 화합물을 피리딘존재하에 화학식 6의 화합물과 반응시켜 얻어진 것을 특징으로 하는 제조방법.

반응식 2



(상기식에서, Ac는 아세틸기를 나타낸 것이며,

X는 각각 독립적으로, Cl, Br 또는 F이다.)

【청구항 8】

제 6항에 있어서, 상기 염기가 K_2CO_3 , Na_2CO_3 또는 Cs_2CO_3 이며, 상기 탈보호제가 염산, 황산, 질산, 초산 또는 삼불화초산인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 9】

제 1항의 네오마이신-옥사졸리디논은 헤테로 이합체를 유효성분으로 하는 항바이러스 치료제 또는 항박테리아 치료제.

【서열목록】

<110> KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY <120> HETERODIMERIC CONJUGATES
OF NEOMYCIN-OXAZOLIDINONE, ITS PREPARATION AND ITS USE <130> 2p-01-13c
<160> 6 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 49 <212> DNA <213>

Artificial Sequence <220> <223> 16s sense <400> 1 aatttaatac gactcactat
 agggcggtcac accttcgggt gaagtggcc 49 <210> 2 <211> 49 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 16s antisense <400> 2 ggccacttca
 cccgaagggtg tgacgcccta tagtgagtcg tattaaatt 49 <210> 3 <211>
 52 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> RRE RNA sense <400>
 3 aatttaatac gactcactat aggggtgggcg cagcttcggc tgacggtaca cc 52 <210>
 4 <211> 52 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> RRE RNA
 antisense <400> 4 ggtgtaccgt cagccgaagc tgcgcccacc ctatagtgag tcgtattaaa tt
 52 <210> 5 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 23S rRNA sense <400> 5 ggactcgctg tgaagatgca gtgta
 25 <210> 6 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 23S rRNA antisense <400> 6 tacactgcat cttcacagcg agtcc

페이지 : 1
수번호 : 5-1-02-5061139-27
출원명 : 과학기술연구원

신청번호 : 특허-2002-0007495
수령방법 : 직접(대전)

접수번호	접수일자	서류명	포대위치	전자화상태
5-1-02-0042413-88	2002.02.08	특허출원서	심사총괄서버	검수완료

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.02.08
【발명의 명칭】	네오마이신 -옥사졸리디논 헤테로 이합체, 그의 제조방법 및 그의 용도
【발명의 영문명칭】	HETERODIMERIC CONJUGATES OF NEOMYCIN-OXAZOLIDINONE, THEIR PREPARATION AND THEIR USE
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술연구원
【출원인코드】	3-1998-007751-8
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	1999-041511-2
【대리인】	
【성명】	한인열
【대리인코드】	9-1998-000618-1
【포괄위임등록번호】	2001-012570-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유재훈
【성명의 영문표기】	YU, Jaehoon
【주민등록번호】	590508-1068019
【우편번호】	133-759
【주소】	서울특별시 성동구 옥수동 436 극동그린아파트 102-1403
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이종국
【성명의 영문표기】	LEE, Jongkook
【주민등록번호】	720210-1457431
【우편번호】	157-882

【주소】 서울특별시 강서구 화곡7동 351-89 중앙화곡하이츠아파트 4-806
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 권미운
【성명의 영문표기】 KWON,Miyun
【주민등록번호】 711230-2123225
【우편번호】 137-030
【주소】 서울특별시 서초구 잠원동 현대아파트 102-105
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 배애님
【성명의 영문표기】 PAE,Ae Nim
【주민등록번호】 620520-2402931
【우편번호】 138-240
【주소】 서울특별시 송파구 신천동 7, 장미아파트 2-405
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 고훈영
【성명의 영문표기】 KOH,Hun Yeong
【주민등록번호】 560919-1000116
【우편번호】 142-107
【주소】 서울특별시 강북구 미아7동 1353 SK북한산시티아파트 110-701
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 6
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대
리인 이원
회 (인) 대리인
한인열 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 10 면 10,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 9 항 397,000 원

【합계】 436,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 218,000 원

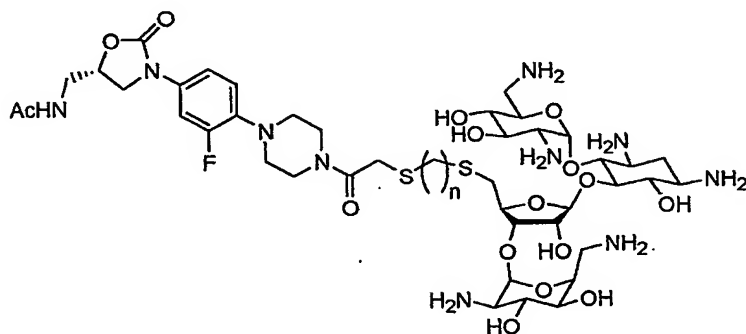
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체, 그의 제조방법 및 그의 용도에 관한 것이다. 상기 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 옥사졸리디논과 네오마이신을 스페이서로 연결된 헤테로 이합체 구조를 가짐으로 RNA 모티프(motif)인 스템(stem)과 룹(loop)을 동시에 인식할 수 있으며, 특정의 RNA에 대해 우수한 결합력을 나타내어 이를 이용하여 항바이러스 치료제 및 항박테리아 치료제로 유용하게 사용할 수 있다.

화학식 1



(상기식에서, Ac 및 n은 명세서 내에서 정의한 바와 같다.)

【색인어】

네오마이신-옥사졸리디논 이합체, 항바이러스제, 항박테리아제

【명세서】**【발명의 명칭】**

네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체, 그의 제조방법 및 그의 용도{HETERODIMERIC CONJUGATES OF NEOMYCIN-OXAZOLIDINONE, THEIR PREPARATION AND THEIR USE}

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <1> 본 발명은 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체, 그의 제조방법 및 그의 용도에 관한 것이다.
- <2> 지금까지의 대부분의 약은 유전자의 마지막 산물인 단백질을 표적 분자로 사용하는 것으로, 전체 약물의 70~80%를 점유하고 있다. 그러나, 단백질을 인코딩(encoding)하는 RNA에 분자가 약의 표적 분자가 될 수 있다는 것이 잘 알려지면서, RNA에 작용할 수 있는 약물에 대한 관심이 높아지고 있다.
- <3> RNA 분자에 대한 구조학적인 연구가 진행되면서, RNA 분자가 가장 안정한 형태가 되기 위해서는 스스로가 폴딩되어 염기쌍(base-pairings)을 이루고 있어야 한다. 특히, RNA는 DNA와는 다르게 염기쌍을 이루지 못하는 부분(loop)을 가지고 있으며, 이들 루프와 함께 독특한 2차 구조 또는 3차 구조를 이루고 있다는 것이 발견되었다. 이들 3차 구조는 결국 염기서열 특이적인 3 차원적인 구조를 형성하고, 작은 화합물들이 잘 결합할 수 있는 안정된 주머니(pocket) 모양을 이루고 있다.

<4> 포켓 모양의 RNA 구조는 세포 내에서 단백질을 생산하는 리보솜(ribosome)을 이루고 있는 리보솜 RNA(ribosomal RNA, rRNA)에서 발견된다. 대장균 등의 병원체에서 단백질을 생산하는 리보솜에서는 16S RNA의 A 사이트(site) 등 RNA 염기 서열이 매우 잘 보존되어 있는 부분이 있으며, 이런 부분은 병원체의 단백질 합성을 억제할 수 있는 목표 작용점이 될 수 있다. 일례로, 아미노글라이코사이드(aminoglycoside)는 아미노기(amino group)를 가지고 있으며, 생리적 pH에서 양전하를 띠는 일반적인 약으로서 음전하된 특정한 부위의 rRNA인 16S rRNA A 사이트에 결합 작용점이 된다는 것이 이미 알려져 있다. NMR 구조연구에 의하면, RNA의 스템(stem)부분에 아미노글라이코사이드가 결합함으로써 스템의 구조가 약간 벌어진 형태의 확장된 루프(extended loop)를 이루는 것이 밝혀졌다. 그러나 이처럼 RNA에 결합하는 아미노글라이코사이드는 그 특이성에서 약간의 문제점을 가지고 있다. 즉, 양전하된 아미노글라이코사이드는 음전하된 RNA의 결합 부위에 잘 결합하지만, 이와 같은 결합은 비교적 특이적이지 못하며, 실제로 아미노글라이코사이드는 2 차원적 또는 3 차원적 구조를 가진 어떤 RNA 에도 마이크로몰(microM) 정도의 결합력을 가지고 있으며, 이런 특이적이지 못한 결합력으로 인하여, 아미노글라이코사이드의 약으로서의 효용성이 떨어지고 있다.

<5> 또한, 특이적인 결합을 보이지 않는 아미노글라이코사이드를 특이적 화합물로 만들려는 시도가 진행되고 있다. 첫 번째로 기존의 아미노글라이코사이드를 이합체(dimer)로 제조하는 것으로, 몇 개의 연구진들이 이와 같은 호모이합체(homodimer)를 만들어 특정 RNA에 특이적인 결합성을 높이는 연구를 진

행하였다. 결합력을 가진 두 개의 같은 부위는 일반적으로 강한 결합력을 나타내는 것으로 알려져 있으므로, 아미노글리코사이드의 호모이합체는 특정 RNA에 특이성이 증진된 형태를 나타낼 수 있으리라 기대했다. 그러나, 아미노글리코사이드 호모이합체는 그 결합 부위가 RNA에 2 개 존재할 때만이 큰 결합력 변화가 관측되었을 뿐, 화합물이 가지는 특이성에는 큰 변화가 없었다. 두번째로, 헤테로 이합체 (hetero-dimer) 아미노글리코사이드를 제조하는 것으로, 아미노글라이코사이드와 새로운 작용기를 가진 화합물을 결합하는 것이다. Tor 연구팀이 최근 진행한 연구에 의하면, 아크리딘(acridine)이라는 조그마한 화합물과 아미노글리코사이드의 결합에 의한 헤테로 이합체는 특정한 RNA(RRE motif)에 각각의 단일체에 비해 약 100배 정도의 특이성의 증진을 나타내었다. 아크리딘의 역할은 염기쌍을 이루고 있는 스템 부분에 돌출된 벌지(bulge)의 염기와 아크리딘 사이의 인식에 의하여 전체적인 결합력이 증진시킨다. 이와 같이, 헤테로 이합체는 두 개의 다른 부분을 인식할 수 있는 두 개의 분자를 연결하는 것이다.

<6> 지금까지 알려진 바로는 아미노글리코사이드의 RNA 결합부위가 RNA의 스템 부분으로, 스템이라는 모양 특이적인 결합력을 가지고 있지만, 염기서열 특이적이지는 못하다는 것이다. 따라서, 특정한 서열을 가진 RNA 모티프에 결합하는 화합물은 룽(loop) 특이적인 구조를 인식할 수 있는 화합물과 스템 특이적 결합을 하는 아미노글리코사이드이 연결된 헤테로 이합체 형태를 가지며, 이를 제조하기 위한 두 화합물의 연결은 특이성 증진을 위하여 매우 중요하다. 본 발명자들은 이미 RNA의 룽에 잘 결합하는 화합물로 알려진 화합물 중에 클로람페니콜을 택하여 아미

노글리코사이드 중에 가장 결합력이 뛰어난 네오마이신과 결합을 시도하였다. 두 화합물의 연결은 네오마이신과 클로람페니콜의 약효 중 가장 덜 영향을 주는 두 부위를 선택하여 합성하였으며, 합성된 헤테로 이합체는 몇가지 RNA 모티프에서 매우 증진된 특이성을 보여주었다.

<7> 한편, 최근에 개발된 항생제 중 하나인 옥사졸리디논(oxazolidinone) 계열의 화합물은 정확한 부위는 아직 밝혀지지 않았으나, 23S rRNA의 일부에 결합하여 약효를 나타내는 RNA 결합 물질로서, 기존에 23S rRNA에 결합하는 크로람페니콜 또는 마크로라이드 등의 결합 부위와는 다른 부위에 결합할 가능성을 제시하고 있다.

<8> 이에, 본 발명자들은 옥사졸리디논과 네오마이신을 스페이서로 결합시킨 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 합성하였으며, 본 발명의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체가 RNA의 모티프인 스템과 룩을 동시에 인식하며, 특정의 RNA에 대한 결합력이 우수하였으며 또한 염기서열 특이적 특성을 가지고 있음을 알아내어 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<9> 본 발명의 목적은 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체, 그의 제조방법 및 그의 용도를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<10> 상기 목적을 달성하기 위해서,

<11> 본 발명은 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 제공한다.

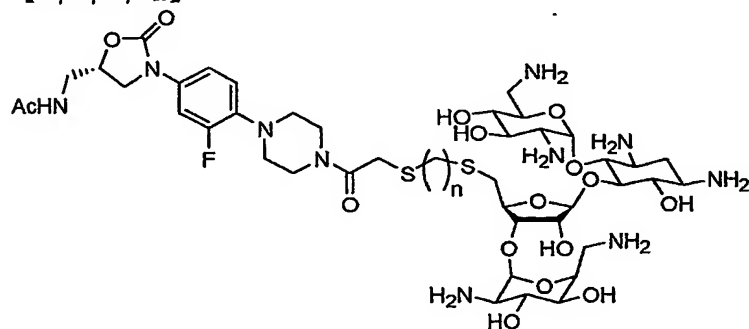
<12> 또한, 본 발명은 상기 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 제조방법을 제공한다.

<13> 또한, 본 발명은 상기 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 유효성분으로 하는 항바이러스 치료제 또는 항박테리아 치료제를 제공한다.

<14> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<15> 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 포함한다.

<16> 【화학식 1】



<17> (상기식에서, n은 2~10의 정수이며, 바람직하게는 6이며,

<18> Ac는 아세틸기를 나타낸 것이다.)

<19> 상기 화학식 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 네오마이신과 옥사졸리디논의 중심 골격을 적당한 길이의 탄소 사슬을 가진 스페이서로 연결되어 헤테로 이합체의 구조를 형성한다.

<20> 구체적으로, RNA의 룩에 잘 결합하는 화합물로 알려진 옥사졸리디논 화합물과 아미노글리코사이드 중에서 RNA에 대한 결합력이 우수한 네오마이신을 상기 두 화합물의 약효 중 가장 덜 영향을 미치는 부위를 선택하여 스페이서를 이용하여 결합하였다. 상기

스페이서는 디메르캡토 화합물을 이용하였으며, 바람직하게는 스페이서의 탄소수가 6이다.

<21> 본 발명의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 특정 RNA의 모티프인 스템과 룩을 동시에 인식할 수 있으며, 이로 인해 특정 RNA(16S rRNA, 23S rRNA)에 대해 결합력이 더욱 향상된다. 하기 실시예에 의하면 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 16S rRNA 또는 23S rRNA에 특이적이며, 강력한 결합력을 나타내고 있다. 구체적으로, 16S rRNA와 23S rRNA에 대해서 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체가 네오마이신에 비해 각각 60 배 및 30 배 이상의 결합력의 향상을 나타내었으며, 옥사졸리디논에 대해 각각 300 배 및 4,000 배의 결합력 증가를 나타내었다. 또한, RRE RNA의 경우에는 결합력의 변화가 오히려 네오마이신 단일체에 비해 떨어지는 결과를 나타내는데, 이는 헤테로 이합체에 의한 결합력의 변화가 관찰되는 RNA도 그 종류에 따라 결합력 향상의 크기가 매우 다르며, RNA 모티프가 모두 스템과 룩을 가지고 있다 하더라도 그 중에서도 특이적인 염기서열을 가진 rRNA만에 대한 특이적인 결합을 나타낼 수 있다. 23S rRNA의 경우 매우 짧은 RNA 서열임에도 불구하고 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체가 가지는 결합력은 향상되었는데, 이는 길이가 비교적 긴 RRE RNA의 경우 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 결합력이 네오마이신 단일체의 결합력에 비해 감소하는 것과 비교할 때 본 발명의 헤테로 이합체는 RNA에 대해 특이적으로 결합함을 알 수 있다.

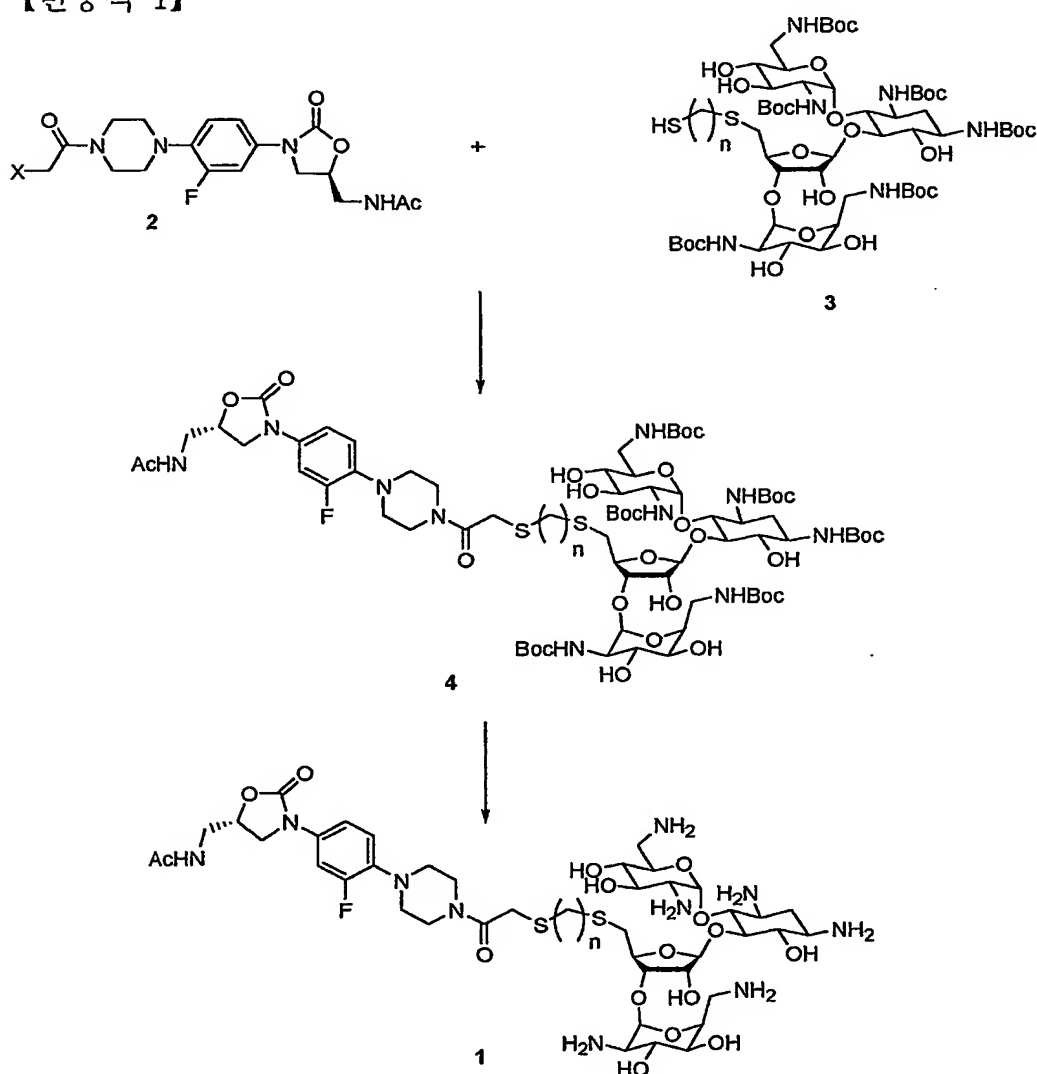
<22> 본 발명은 하기 반응식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 제조방법을 포함한다.

<23> 구체적으로, 하기 반응식 1에서 보는 바와 같이,

<24> 화학식 2의 화합물을 염기 존재하에 화학식 3의 화합물과 반응시켜 화학식 4의 화합물을 얻는 단계(단계 1); 및

<25> 얻어진 화학식 4의 화합물과 탈보호제를 반응시켜 화학식 1의 화합물을 얻는 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 제조방법을 포함한다.

<26> 【반응식 1】

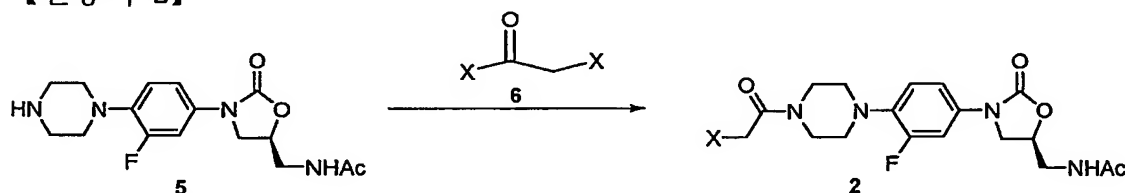


<27> (상기식에서, n 이 2~10의 정수이며, 바람직하게는 6이며,

<28> X 는 플루오로, 클로로 또는 브롬이며,

- <29> Ac는 아세틸기이며,
- <30> Boc는 *t*-부틸옥시카르보닐기를 나타낸 것이다.)
- <31> 단계 1은 염기존재하에 화학식 2의 화합물과 화학식 3의 화합물을 상온에서 5~10 시간동안 반응시켜 화학식 4의 화합물을 얻는 것으로, 상기 염기는 K_2CO_3 , Na_2CO_3 또는 Cs_2CO_3 를 사용하며, 바람직하게는 Cs_2CO_3 를 사용한다. 이때 용매는 DMF(dimethylformamide), DMSO(dimethyl sulfoxide) 또는 아세토니트릴(acetonitrile)을 사용하며, 바람직하게는 DMF를 사용한다.
- <32> 단계 2는 얻어진 화학식 4의 화합물의 *t*-부틸옥시카르보닐기(*t*-butyloxycarbonyl, Boc)을 탈보호하기 위해 염산, 황산, 질산, 초산 또는 삼불화초산을 사용하며, 바람직하게는 삼불화초산을 사용한다.
- <33> 또한, 상기 화학식 2의 화합물은 하기 반응식 2와 같이, 하기 화학식 5의 화합물을 염기 존재하에 화학식 6의 화합물과 반응시켜 얻어진다. 바람직하게 상기 반응시 염기는 피리딘을 사용하며, 용매는 CH_2Cl_2 를 사용한다. 또한, 반응온도는 $0^\circ C$ 이며, 반응시간은 2 시간이 바람직하다.

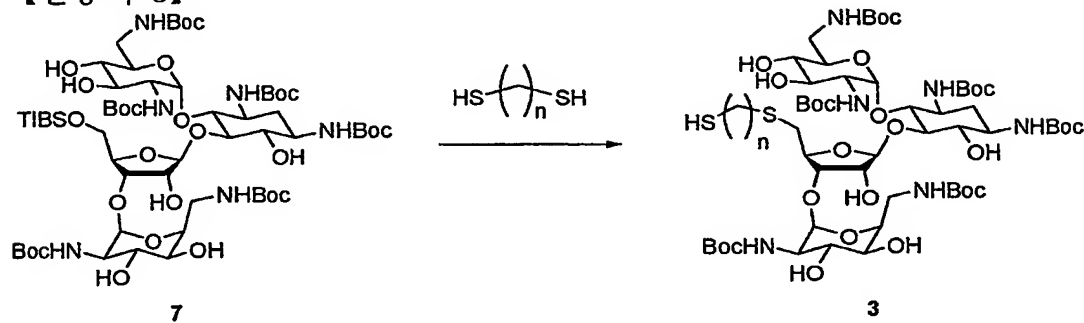
<34> 【반응식 2】



- <35> (상기식에서, Ac는 아세틸기를 나타낸 것이며,
- <36> X는 각각 독립적으로, Cl, Br 또는 F이다.)

<37> 상기 화학식 3의 화합물은 하기 반응식 3과 같이, 화학식 7의 화합물을 염기 존재 하에 디메르캅토 화합물과 반응시켜 얻어진다.

<38> 【반응식 3】



<39> (상기식에서, n 은 2~10의 정수이며, 바람직하게는 6이며,

<40> Boc는 t-부틸옥시카르보닐기를 나타낸 것이며,

<41> TIBSO는 트리이소프로필술포닐기를 나타낸 것이며,

<42> n 은 2~10의 정수이며, 바람직하게는 6이다.)

<43> 화학식 7로 표시되는 화합물은 네오마이신으로부터 종래 공지된 방법으로 제조하였다.

<44> 화학식 3의 화합물은 구체적으로, 디메르캅토 화합물과 화학식 7의 화합물을 염기 존재하에 치환반응시켜 제조한다. 상기 디메르캅토 화합물은 1,6-헥산디티올이 바람직하며, 염기는 K_2CO_3 , Na_2CO_3 또는 Cs_2CO_3 를 사용하며, 또한 용매는 DMF, DMSO 또는 아세토니트릴을 사용한다.

<45> 또한, 본 발명은 상기 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 유효성분으로 하는 항바이러스 치료제 또는 항박테리아 치료제를 포함한다.

- <46> 본 발명의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 RNA 모티프인 스템과 립을 동시에 인식할 수 있어 대장균 등의 병원체에서 리보솜에 존재하는 특정의 RNA(16S rRNA, RRE RNA, 23S rRNA)에 대해 우수한 결합력을 나타내며, 이로 인해 병원체의 단백질의 합성을 억제할 수 있는 항바이러스 치료제 또는 항박테리아 치료제로 사용할 수 있다.
- <47> 화학식 1의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체는 임상투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 화학식 1의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- <48> 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 물활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 적절히 선택되

나, 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 화학식 1의 화합물을 0.1~50 mg의 양으로 1회 내지 수회 나누어 투여할 수 있으며, 바람직하기로는 0.1~10 mg이다.

<49> 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다.

<50> 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<51> <제조예 1> 화학식 2의 화합물 제조

<52> 34 mg(0.10 mmol)의 화학식 5의 옥사졸리디논 유도체(Oxazolidinone derivative, Brickner et al., *J. Med. Chem.* 1996, 39, 673~679)에 이염화탄소 (2.0 mL)를 첨가한 현탁액에 피리딘(0.025 mL, 0.31 mmol)과 브로모아세틸 브로마이드(bromoacetyl bromide; 0.013 mL, 0.15 mmol)를 0 °C에서 첨가하였다. 얻어진 반응혼합물을 같은 온도에서 1시간 동안 교반한 후 에틸 아세테이트로 희석시켰다. 얻어진 혼합물을 소금물로 세척한 후 유층을 무수 Na₂SO₄로 건조시키고 감압농축하였다. 얻어진 농축물을 실리카겔 크로마토그래피(CH₂Cl₂:MeOH=10:1)로 정제하여 흰색의 고체인 화학식 2의 화합물(33 mg, 72%)를 얻었다.

<53> ¹H NMR(CDCl₃, 300 MHz) δ 7.50 (dd, J=14.2, 2.5 Hz, 1H), 7.10 (dd, J=8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.99 (t, J=9.0 Hz, 1H), 6.13 (t, J=6.1 Hz, 1H), 4.82~4.76 (m, 1H), 4.13~3.51 (m, 10H), 3.16 (t, J=4.9 Hz, 2H), 3.08 (t, J=5.0 Hz, 2H), 2.04 (s, 3H).

<54> <실시예 1> 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 제조

<55> (단계 1) 화학식 4의 화합물의 제조

<56> DMF(1.5 ml)에 화학식 3의 화합물(97 mg, 0.072 mmol)과 화학식 2의 화합물(33 mg, 0.072 mmol)를 용해한 후 Cs_2CO_3 (24 mg, 0.074 mmol)를 첨가하였다. 얻어진 반응혼합물을 15시간 동안 교반한 후 반응혼합물을 물에 부었다. 에틸 아세테이트(100 ml)로 추출한 후 유층을 소금물로 세척하였다. 상기 유층을 무수 Na_2SO_4 로 건조시킨 후 감압농축하였다. 얻어진 농축물을 실리카겔 크로마토그래피($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=10:1$)로 정제하여 흰색의 고체인 화학식 4의 화합물(101 mg, 81%)을 얻었다.

<57> ^1H NMR(CD_3OD , 300 MHz) δ 7.53 (dd, $J=14.5, 2.4$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J=8.8$ Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.07 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 6.68 (br d, $J=6.68$ Hz, 1H), 6.49 (br d, $J=6.3$ Hz, 1H), 5.32 (br s, 1H), 5.19 (br s, 1H), 4.94 (br s, 1H), 4.83~4.75 (m, 1H), 4.23~2.60 (m, 39 H), 1.97 (s, 3H), 1.65~1.24 (m, 64H).

<58> (단계 2) 화학식 1의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 제조

<59> 상기 화학식 4의 화합물(101 mg, 0.059 mmol)과 삼불화초산(Trifluoroacetic acid, TFA; 1.5 ml)을 혼합하고 30분간 상온에서 교반하였다. 얻어진 반응혼합물을 감압농축한 후 얻어진 농축물을 prep-HPLC (RP-C18 column, 0.1 % TFA를 함유한 $\text{H}_2\text{O}:0.1$ % TFA를 함유한 $\text{MeCN}=70:30$)로 정제하고 동결건조하여 흰색의 고체인 화학식 1의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체(78 mg, 69 %)를 얻었다.

<60> ^1H NMR(D_2O , 300 MHz) δ 7.09 (dd, $J=14.0, 1.9$ Hz, 1H), 6.91~6.87 (m, 2H), 5.70 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 4.94 (d, $J=1.4$ Hz, 1H), 4.04~2.69 (m, 38H), 2.45 (dd, $J=13.4, 7.6$ Hz, 1H), 2.27 (q, $J=7.3$ Hz, 4H), 2.17~2.11 (m, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.54 (q, $J=12.6$ Hz, 1H), 1.29~1.18 (m, 4H), 1.05~1.01 (m, 4H).

- <61> ^{13}C NMR(D_2O , 75 MHz) δ 175.2, 171.2, 163.9 (q, $J=35.2$ Hz), 157.0, 134.7, 120.9, 116.7 (q, $J=290.1$ Hz), 116.2, 110.8, 109.0, 108.7, 96.0, 95.5, 85.8, 80.5, 78.9, 75.4, 74.1, 73.2, 72.8, 71.3, 70.4, 69.8, 68.3, 68.0, 67.7, 54.0, 51.4, 51.2, 51.0, 50.0, 48.7, 48.6, 46.2, 42.1, 40.8, 40.7, 34.6, 33.0, 32.1, 31.9, 29.1, 28.7, 28.3, 27.9, 27.7, 22.1.
- <62> <제조예 2> 특이적 RNA의 실험관적 제법
- <63> 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 16S rRNA의 센스 RNA와 서열번호 2로 기재되는 16S rRNA의 안티센스 RNA,
- <64> 서열번호 3으로 기재되는 RRE RNA의 센스 RNA와 서열번호 4로 기재되는 RRE RNA의 안티센스 RNA, 및
- <65> 서열번호 5로 기재되는 23S rRNA의 센스 RNA와 서열번호 6으로 기재되는 23S rRNA의 안티센스 RNA를 제조하였다.
- <66> 구체적으로, 두 가닥의 DNA(센스 (sense)와 안티센스(anti-sense), 각각 2.5 nanomole), 5 \times 완충용액(200 mM Tris-HCl, 30 mM MgCl_2 , 10 mM 스퍼미딘(spermidine), 50 mM NaCl, pH 7.9; 20 μl), 100 mM DL-다이하이오트레이톨(dithiotheitol, DTT; 20 μl), 네 개의 2.5 mM 뉴클레오타이드 트라이 포스페이트 혼합물(NTP 혼합물, 20 μl), T7 RNA 폴리머라제(polymerase, 50 units/ml; 1 μl) 및 증류된 물(34 μl)을 37°C에서 2 시간동안 배양하였다. 이후, 1 μl 의 RNA 분해효소가 들어있지 않은(RNase-free) RQ1 DNA 분해효소(DNase, 1 unit/ml)를 첨가하고 10 분간 37°C에서 배양하였다. 얻어진 용액에 100 μl 의 PCI 혼합액 (페놀:클로로포름:이소프로판올=25:24:1)을 첨가하고 5 분간 상온

에서 흔들었다. 얻어진 용액을 14000 rpm에서 10 분간 원심 분리하였다. 상등액을 새로운 튜브에 넣고 에탄올 침전에 의하여 RNA를 농축시켰다. 얻어진 RNA는 20 mA의 전기를 걸어 30 분간 전기영동하여 7.0 M 우레아(urea)가 함유된 6 %의 폴리아크릴아미드(polyacrylamide)에서 정제하였다. UV 손전등에 의하여 밝혀진 RNA 밴드(band)를 자르고 새로운 튜브에 옮겨 500 μ l의 용출 완충용액(elution buffer, 0.5 M 암모늄 아세테이트(ammonium acetate), 1 mM EDTA, 0.2 % SDS, pH 8.0)을 첨가하고 37°C에서 4 시간동안 방치하였다. 용출된 RNA를 새튜브로 옮기고 페놀추출법 및 에탄올 침전법에 의하여 정제하였다. 정제 된 RNA의 양은 260 nm UV 스펙트럼으로 확인하였다.

<67> <실험에 1> 특이적 RNA에 결합하는 상수의 결정

<68> 테트라메틸로다민(Tetramethylrhodamine)이 결합된 파로모마이신(paromomycin, 하기 "CRP"라 칭한다.)은 하바드 의과대학의 란도(Rando) 교수팀에서 얻어서 사용하였으며, 이것을 형광 발광화합물(fluorescent probe)로 사용하였다. 형광 비등방성(anisotropy) 측정은 Perkin-Elmer LS-50B 형광 분광측정기에 20°C의 항온조를 설치하여 수행하였다. CRP의 형광흡수는 510 nm 또한 그 형광발광은 550 nm에서 관찰하였다. 데이터 한점을 얻는데 적어도 7 번의 측정을 수행하였으며 그 중 가장 큰 값과 가장 작은 값을 제거하고 다섯 개의 평균값을 데이터로 이용하였다. 형광의 측정은 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl₂, 및 20 mM HEPES pH 7.5를 이용한 완충용액에서 수행하였다. CRP와 제조된 RNA간의 결합상수(Kd)를 측정하는 식은 하기 수학적 식 1과 같다.

<69>
$$A = A_0 + DA \{ ([RNA]_0 + [CRP]_0 + K_d) - ([RNA]_0 + [CRP]_0 + K_d)^2 - 4[RNA]_0[CRP]_0 \}^{1/2} \div 2$$

【수학적 식 1】

<70> (상기식에서,

- <71> A는 RNA가 있을 때의 CRP의 형광 이동방성 값이며,
 <72> A_0 는 RNA가 없을 때의 CRP의 형광 이동방성 값이며,
 <73> DA는 여러 RNA 농도에서 RNA가 없을 때의 형광 이동방성의 값을 뺀 숫자이며,
 <74> $[RNA]_0$ 는 RNA의 초기 농도이며,
 <75> $[CRP]_0$ 는 CRP의 초기 농도이며,
 <76> K_d 는 결합상수이다.)
 <77> 상기 RNA와 CRP의 결합을 유도한 후에 새롭게 제조된 화합물을 용액에 넣으면, 경쟁적인 결합 반응에 의하여 CRP는 RNA로부터 분리되고 측정하고자 하는 화합물은 RNA에 결합하여 KD 값을 가지게 된다. 이 KD 값을 산출하는 식은 하기 수학식 2와 같으며, K_d 와 KD 는 일직선이 아닌 커브 맞춤(non-linear curve fitting) 방법에 의하여 산출하였다. 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

$$\text{<78> } [Aminoglycoside]_0 = \{KD(A_\infty - A) / [K_d(A - A_0) + 1]\} \times \{[RNA]_0 - K_d(A - A_0) / (A_\infty - A_0) -$$

$$[CRP]_0(A - A_0) / (A_\infty - A_0)\}$$

【수학식 2】

- <79> (상기 식에서,
 <80> KD 는 RNA와 새로운 아미노글리코사이드와의 결합상수이며,
 <81> $[Aminoglycoside]_0$ 는 측정하고자 하는 아미노글리코사이드의 초기농도이며,
 <82> A는 측정도중 형광 이동방성 값이며,
 <83> A_∞ 는 모두 결합되어 있을 때 형광 이동방성 값이며,
 <84> A_0 는 모두 자유로울때의 형광 이동방성 값이다.)

<85> 【표 1】

각 RNA에 대한 헤테로 이합체의 결합력 비교(KD) (단위 microM)

	네오마이신	옥사졸리디논	네오마이신-옥사졸리디논
16S rRNA	> 2	10.3	0.034
RRE RNA	0.18	결합하지 않음	0.54
23S rRNA	> 2	260	0.063

<86> 상기 표 1에서 나타낸 바와 같이, 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로-이합체 화합물은 16S rRNA 또는 23S rRNA에 네오마이신에 비하여 증진된 결합력을 나타내었으므로, 일반적인 이합체 결합력의 증진이 본 발명에서도 관찰되어진다. 하지만 RRE RNA의 경우에는 결합력의 변화가 오히려 네오마이신 자체에 비하여 떨어지는 결과를 나타내어 헤테로-이합체에 의한 결합력의 변화가 관찰되는 RNA와 그 종류에 따라 결합력 향상의 크기가 매우 다르게 나타남을 알 수 있다. 구체적으로, 16S rRNA와 23S rRNA의 경우에는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체가 네오마이신 단일체에 비하여 각각 60 배 및 30 배 이상의 결합력의 증진을 나타내었으며, 옥사졸리디논 단일체에 비해 각각 300 배 및 4,000 배의 결합력 증가를 관찰할 수 있었다. 상기와 같은 결과는 본 발명에서 제조된 3 개의 RNA 모티프가 모두 스템과 립을 가지고 있다 하더라도, 그 중에서도 특이적인 염기서열을 가진 rRNA 만이 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로-이합체에 의한 결합력 증가를 나타내고 있으며, 그 결합력의 증가는 23S rRNA의 경우에 가장 크게 관찰되었다. 23S rRNA의 경우, 매우 짧은 RNA 서열임에도 불구하고 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로-이합체가 가지는 결합력은 향상함을 관찰할 수 있는데, 이는 길이가 비교적 긴 RRE RNA의 경우 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로-이합체의 결합력이 네오마이신 자체에 비하여 감소하는 것과 비교되며, 이로 인해 헤테로-이합체의 특이성을 나타내음을 알 수 있다.

<87> <실험예 2> 랫트에 대한 비경구투여 급성 독성 실험

<88> 화학식 1의 화합물의 급성 독성을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다

<89> 6주령의 특정병원부재(SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성 실험을 실시하였다.

본 발명의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 1 ml의 생리식염수에 현탁하여 1 mg/kg의 용량으로 상기 랫트 2 마리의 근육내 주사 투여하였다. 시험물질 투여후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다.

<90> 실험결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상 증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 실험된 화합물은 랫트에서 10 mg/kg 까지 독성변화를 나타내지 않았으며, 비경구 투여 최소치사량(LD₅₀)은 10 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

【발명의 효과】

<91> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로-이합체는 단위체인 네오마이신 및 옥사졸리디논에 비하여 특정한 RNA(16S rRNA, 23S RNA)에 대해 결합력이 우수하며, RNA 모티프인 스템과 룬을 동시에 인식할 수 있으며, 또한 RNA를 이루는 염기서열에 특이적인 특성을 가지고 있다. 이와 같이, 특이적 RNA를 부분을 인식할 수 있는 특이성의 증가는 약의 효능을 증진시킬 수 있을 뿐만

020007495

출력 일자: 2002/7/22

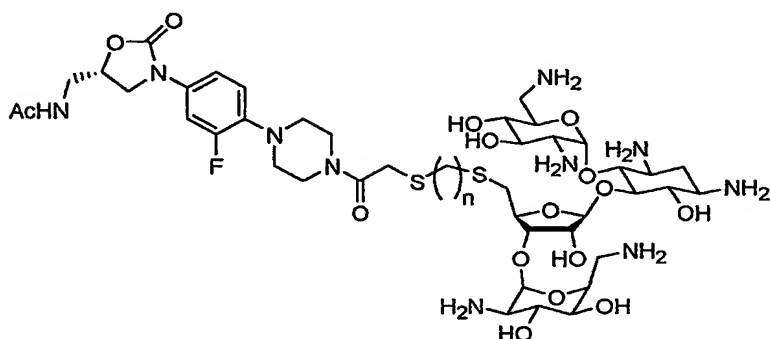
아니라 비특이적 약물에 의한 부작용을 대폭적으로 감소시켜 기존의 약에 비하여 더욱
효능이 우수한 약으로 유용하게 사용할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 화학식 1로 표시되는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체.

화학식 1



(상기식에서, n 은 2~10인 정수이며,

Ac는 아세틸기를 나타낸 것이다.)

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 n 이 6인 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체가 16S rRNA, RRE RNA 또는 23S rRNA와 특이적인 결합을 형성하는 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 특이적인 결합이 RNA의 스템과 립을 동시에 인식하는 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체.

【청구항 5】

제 3항에 있어서, 상기 특이적인 결합이 RNA를 이루는 염기서열 특이적인 결합인 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체.

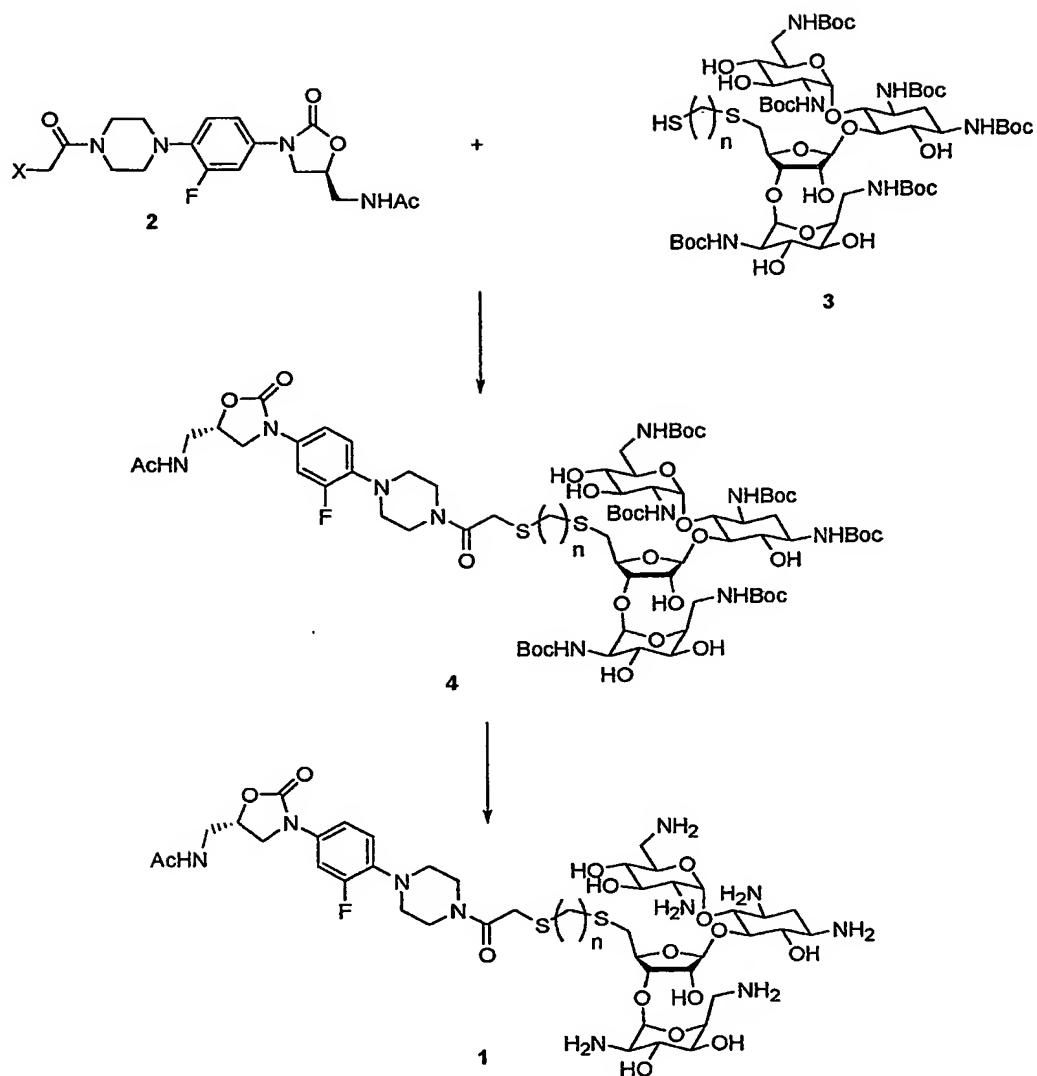
【청구항 6】

하기 반응식 1에서 보는 바와 같이,

화학식 2의 화합물을 염기 존재하에 화학식 3의 화합물과 반응시켜 화학식 4의 화합물을 얻는 단계(단계 1); 및

얻어진 화학식 4의 화합물과 탈보호제를 반응시켜 화학식 1의 화합물을 얻는 것을 특징으로 하는 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체의 제조방법.

반응식 1



(상기식에서, n 이 2~10의 정수이며,

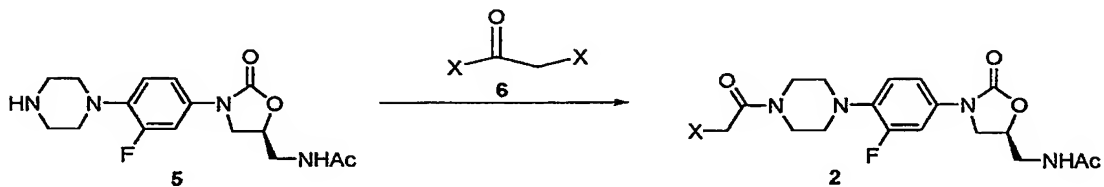
X는 플루오로, 클로로 또는 브롬이며,

Boc는 *t*-부틸옥시카르보닐기를 나타낸 것이다.)

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 상기 화학식 2의 화합물이 하기 반응식 2와 같이, 하기 화학식 5의 화합물을 피리딘존재하에 화학식 6의 화합물과 반응시켜 얻어진 것을 특징으로 하는 제조방법.

반응식 2



(상기식에서, Ac는 아세틸기를 나타낸 것이며,

X는 각각 독립적으로, Cl, Br 또는 F이다.)

【청구항 8】

제 6항에 있어서, 상기 염기가 K_2CO_3 , Na_2CO_3 또는 Cs_2CO_3 이며, 상기 탈보호제가 염산, 황산, 질산, 초산 또는 삼불화초산인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 9】

제 1항의 네오마이신-옥사졸리디논 헤테로 이합체를 유효성분으로 하는 항바이러스 치료제 또는 항박테리아 치료제.

【서열목록】

<110> KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY <120> HETERODIMERIC CONJUGATES
OF NEOMYCIN-OXAZOLIDINONE, ITS PREPARATION AND ITS USE <130> 2p-01-13c
<160> 6 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 49 <212> DNA <213>

Artificial Sequence <220> <223> 16s sense <400> 1 aatttaatac gactcactat
 agggcggtcac accttcgggt gaagtggcc 49 <210> 2 <211> 49 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 16s antisense <400> 2 ggccacttca
 cccgaaggtg tgacgcccta tagtgagtcg tattaaatt 49 <210> 3 <211>
 52 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> RRE RNA sense <400>
 3 aatttaatac gactcactat aggggtgggcg cagcttcggc tgacggtaca cc 52 <210>
 4 <211> 52 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> RRE RNA
 antisense <400> 4 ggtgtaccgt cagccgaagc tgcgccacc ctatagtgag tcgtattaaa tt
 52 <210> 5 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 23S rRNA sense <400> 5 ggactcgctg tgaagatgca gtgta
 25 <210> 6 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 23S rRNA antisense <400> 6 tacactgcat cttcacagcg agtcc
 25